



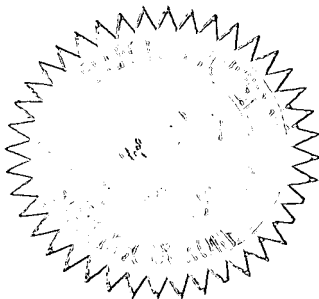
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0049091
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 08월 20일
Date of Application
AUG 20, 2002

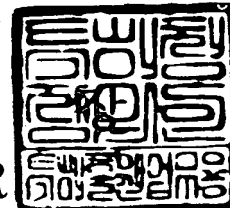
출원인 : (주) 한약마을 외 1명
Applicant(s)
HERB VALLEY Co., Ltd., et al.



2005 년 02 월 02 일

특 허 청

COMMISSIONER



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.03
【구명의인(양도인)】	
【성명】	홍선표
【출원인코드】	4-2002-029894-5
【사건과의 관계】	출원인
【구명의인(양도인)】	
【성명】	김재영
【출원인코드】	4-2002-029892-2
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(주) 한약마을
【출원인코드】	1-2003-012618-1
【신명의인(양수인)】	
【성명】	송미원
【출원인코드】	4-2004-003323-0
【대리인】	
【성명】	신동인
【대리인코드】	9-2000-000156-1
【포괄위임등록번호】	2002-062943-6
【포괄위임등록번호】	2002-062954-1
【포괄위임등록번호】	2003-021561-9
【포괄위임등록번호】	2004-006559-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0049091
【출원일자】	2002.08.20
【심사청구일자】	2002.08.20
【발명의 명칭】	도인 또는 행인으로부터 아미그달린을 효과적으로 얻는 추출방법
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0047413
【출원일자】	2002.08.12

【심사청구일자】

2002.08.12

【발명의 명칭】

아미그달린과 네오아미그달린의 역상 고성능 액체 크로마토그래피 분리법 개발 및 미그달린의 라세미화 억제를 위한 최적 조건을 얻는 방법

【변경원인】

전부양도

【취지】

특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인
신동인 (인)

【수수료】

26,000 원

【첨부서류】

1. 양도증_1통 2.인감증명서_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서		
【권리구분】	특허		
【수신처】	특허청장		
【참조번호】	0001		
【제출일자】	2002.08.20		
【발명의 명칭】	도인 또는 행인으로부터 아미그달린을 효과적으로 얻는 추출방법		
【발명의 영문명칭】	Extraction method for effectively obtaining amygdalin from Persicae Semen and Armenicae Semen		
【출원인】			
【성명】	홍선표		
【출원인코드】	4-2002-029894-5		
【출원인】			
【성명】	김재영		
【출원인코드】	4-2002-029892-2		
【대리인】			
【성명】	신동인		
【대리인코드】	9-2000-000156-1		
【포괄위임등록번호】	2002-062943-6		
【포괄위임등록번호】	2002-062954-1		
【발명자】			
【성명】	홍선표		
【출원인코드】	4-2002-029894-5		
【발명자】			
【성명】	김재영		
【출원인코드】	4-2002-029892-2		
【심사청구】	청구		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 신동인 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	13	면	13,000 원

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	10	항	429,000	원
【합계】	471,000		원	
【감면사유】	개인 (70%감면)			
【감면후 수수료】	141,300		원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통			

【요약서】**【요약】**

본 발명은 살구나무(*Prunus armeniaca* Linne Var. *ansu* Maximowicz)의 종자인 행인 또는 도인을 안전하고 효과적인 항암제로 개발하기 위하여, 에멀신(emulsin)의 영향으로 분해되지 않고 아미그달린(amygdalin)을 효과적으로 추출하는 조건 및 방법을 제공한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

살구나무, 도인, 행인, 항암제, 아미그달린, 에멀신

【명세서】

【발명의 명칭】

도인 또는 행인으로부터 아미그달린을 효과적으로 얻는 추출방법{Extraction method for effectively obtaining amygdalin from Persicae Semen and Armenicae Semen}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 시료로 사용된 도인을 물로 추출한 후, 25% 메탄올을 이동상으로 사용하여 역상 분리한 크로마토그램을 나타내며,

도 2는 외피한 도인을 메탄올로 추출시, 절단 크기별 아미그달린(amygdalin)의 추출율을 나타낸 도이며,

도 3은 거피한 도인을 메탄올로 추출시, 절단 크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이고,

도 4는 외피한 도인을 물로 추출시, 절단크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이고,

도 5는 거피한 도인을 물로 추출시, 절단크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이며,

도 6은 물로 추출시 에멀신(emulsin)의 작용을 알아보는 도이며,

도 7은 외피한 행인을 메탄올로 추출시, 절단 크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이고,

도 8은 거피한 행인을 메탄올로 추출시, 절단 크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이고,

도 9는 외피한 행인을 물로 추출시, 절단크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이고,

도 10은 거피한 행인을 물로 추출시, 절단크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이며,

도 11은 거피한 행인을 끓는 물로 추출시, 절단크기별 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이며,

도 12는 거피한 통째의 행인을 0.1% 구연산 함유하는 끓는 물로 추출시, 아미그달린의 추출율을 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <13> 본 발명은 항암 효과를 갖는 도인 또는 행인에 함유되어 있는 아미그달린(amygdalin)을 효과적으로 추출하는 방법에 관한 것이다.
- <14> 암은 21세기 인간의 수명 연장을 위해 최우선적으로 극복해야할 과제로서, 현재 노년인구의 증가와 환경의 악화로 세계 암 발생률이 매년 5% 이상 증가하고 있으며, 1997년 암이 원인이 된 사망자가 600만명으로 세계 사망률의 12%에 달하고 있다. 국내 암환자는 매년 10만명이 새롭게 발생하고 5만 여명이 매년 사망하는 것으로, 매년 암환자 증가율이 10% 정도이며, 1997년에 암환자는 12만명으로서 남자는 위암(21%), 간암(12%), 폐암(11%)의 순서이며, 여자는 자궁경부암(20%), 위암(16%), 유방암(13%)의 순서로 발생을 하고 있다.
- <15> 대부분의 항암제는 암세포의 각종 대사경로(代謝經路)에 개입하여 주로 핵산의 합성을 억제하거나 항암활성(抗癌活性)을 나타내는 약제이다. 그러나 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직세포에도 손상을 입히기 때문에 골수기능저하, 위장장애, 탈모증 등의 여러 가지 부작용이 나타나게 된다. 현재 암치료에 사용되고 있는 항암제는 생화학적인 작용 기전에 따라 6개의 범주로 분류하고 있다.
- <16> 항암제의 종류로는 크게 화학요법제와 생물학적으로 분류되는데, 화학요법제로는 반응성이 높아서 세포에 작용하면 DNA의 구조를 변형시키고 사슬절단을 일으키는 알킬화제(alkylating agents), 암세포의 증식에 필요한 대사과정을 저해하는 작용을 가지는 대사길항제(代謝拮抗劑, antimetabolites), 세균에서 생산되는 항생물질 중 항암작용을 나타내는 항생물

질(抗生物質, antibiotics), 천연물, 호르몬제 등의 합성된 화학물질이며, 생물학적요법제는 치료백신, 단일항체, 사이토카인을 이용하여 암세포에 대한 암환자의 면역반응을 높여 암세포를 제거하는 면역요법제, 분열시기 특이성 약물로서 유사분열 시기중의 중기(metaphase)에서 세포분열을 중지시키는 유사분열억제제(有絲分裂抑制劑, vinca alkaloid), 유전자의 결핍이나 돌연변이에 의해 유발된 암환자들에게 유전물질을 투여하여 잘못된 유전자를 조정하고 세포 또는 조직내에서 치료 단백질을 생성하여 암을 치료하는 유전자 치료제, 암을 일으키는 발암유전자에 선택적으로 결합할 수 있는 핵산 조각으로서 암세포의 발암유전자의 작용을 억제하는 안티센스 항암제, 혈관신생형성 억제제 등이 있다.

<17> 항암제는 정상세포와 암세포간의 약에 대한 감수성의 차를 이용하여 정상세포에 대한 독성은 비교적 적고 암세포에 대해서는 보다 선택적으로 작용하지만, 정상세포도 어느 정도의 손상을 받기 때문에 부작용이 나타나게 된다. 항암제는 분열이 빠른 세포에는 어디라도 작용하는 성질이 있기 때문에 빨리 분열하는 암세포에만 작용하는 것이 아니라 정상세포인 골수(骨髓), 위장관(胃腸管), 모근세포(毛根細胞)도 역시 분열이 빠르므로 항암제의 영향을 받게되며, 이런 약의 공통적인 부작용으로 혈구(血球) 감소, 구역질, 구토, 설사, 식욕감퇴, 탈모 등이 나타나게 된다.

<18> 그동안 암환자 치료에 사용중인 항암제가 상당히 발전되었음에도 불구하고, 부작용, 항암제 내성, 재발이 없는 완벽한 항암제가 아직 없는 상황이므로, 독성이 없어 안전하고 효과적인 항암제 개발을 위해 천연 한방체제를 이용하여 개발하고자 하는 것이다.

<19> 본 발명에서 사용한 행인(杏仁)은 벚나무과(Amygdalaceae)에 속하는 살구나무(

Prunus armeniaca Linne Var. *ansu* Maximowicz) 또는 그 밖의 동속 근연 식물(同屬近緣植物)의 씨로서 천식, 호흡곤란, 부종 등에 널리 이용되고 있는 생약으로, 약 3%의 아미그달린(amygdalin)계, 지방유(행인유)계 50%, 각종 유질 아미노산이 함유되어있으며, 비타민 B17인 아미그달린은 행인중의 아미그달라제(amygdalase) 및 프루나제(prunase) 등 베타-글리코시다제(β -glycosidase)에 의해 가수분해되어 차례로 프루나신(prunasin)과 벤즈알데히드를 생성하고 다시 분해되어 벤즈알데히드와 시안화수소(HCN)를 생성한다(정 보섭 및 신 민교; 향약대사전, 영림사, pp625~626, 1998).

<20> 또한 도인(桃仁)은 장미과(Rosaceae)에 속하는 복숭아 나무(*Prunus persica* Batsch), 개복숭아 나무(*Prunus persica* Batsch var. *dauriana* Maximowicz)의 씨로서 율화작용, 구어혈의 목적으로 한방에서 많이 사용되는 생약으로, 약 3.6%의 아미그달린, 정유 0.4%, 지방유 45%를 함유하고 유(油) 중에는 주로 올레핀(olefin)계 글리세린, 소량의 리놀(linol)계 글리세린, 그 외에 팔미트산, 스테아린산, 콜린, 아세틸콜린, 에멀신(emulsin) 등도 함유되어 있다(정 보섭 및 신 민교; 향약대사전, 영림사, p632, 1998). 행인 및 도인의 주성분인 시안화수소산글리코시드 즉, 아미그달린은 청산(靑酸)배당체로서 수분의 존재하에서는 에멀신에 의해서 만델로니트릴(mandelonitrile)을 거쳐서 벤즈알데히드, 시안화수소 및 글루코스로 분해되며, 최근에 아미그달린이 보통 화학요법제에서 나타나는 생리학적인 독성없이 암병변에서 특이하게 악성 세포를 죽일 수 있다는 보고들(Syrigos, K.N., Rowlinson-Busza, G. and Epenetos, A.A., *International Journal of Cancer*, 78, pp712-719, 1998)이 있으며, 실제로 아미그달린을 이용한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

<21> 이점에 착안하여 가격이 저렴한 행인 및 도인을 포함한 한방제제를 이용하여 부작용이 없는 항암제로 개발하고자 하는 것이다.

<22> 일반적으로 한방제제에서, 도인은 껍질을 벗기지 않은 채로 가루상태에서 물로 추출하여 사용하며, 행인은 껍질을 벗긴 채로 가루상태에서 물로 추출하여 사용한다. 그러나 행인 및 도인을 가루상태에서 물로 추출하면, 행인 및 도인 중에 함유되어 있는 에멀신의 작용에 의해서 아미그달린의 대부분을 분해시키므로, 껍질채인 도인의 경우 0.08%, 껍질을 벗긴 행인의 경우 0.24%의 아미그달린만이 탕제 중에 잔존하고 있다고 본 발명자 등이 보고한 바 있다(황은영, 이상수, 이제현, 홍선표, *Archives of Pharamcal Research*, 25(4), 2002). 현재 통용되는 제조방법으로는 기타의 약리작용은 나타낼 수 있을지 모르나 항암제로의 약리작용을 나타내기에 충분하지 않으며, 또한 아미그달린을 분해되지 않은 상태로 추출했다 하더라도, 추출된 아미그달린의 절반정도는 항암 효과가 없는 네오아미그달린(neoamygdalin)으로 변환하기 때문에 이 점들을 보완하지 않으면 항암제로의 개발은 불가능하다.

<23> 연구 결과, 본 발명은 도인 및 행인 중의 아미그달린을 추출하는 데 있어서 에멀신의 영향을 전혀 받지 않는 적합한 추출조건을 찾아내어, 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<24> 본 발명의 목적은 항암 효과를 가지는 도인 또는 행인에 함유되어 있는 아미그달린(amygdalin)을 효율적으로 추출하는 조건 및 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <25> 상기 목적에 따라, 본 발명은 도인(桃仁) 또는 행인(杏仁)으로부터 아미그달린 (amygdalin)을 산성조건하에서 추출용매로 추출함에 있어서, 도인 또는 행인의 절단면의 표면적을 이용함을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- <26> 상기 도인 또는 행인은 바람직하게는 거피하여 사용함을 특징으로 하는 방법을 포함한다.
- <27> 상기 추출 용매로는 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 하나 이상의 혼합용매를 사용하는 것을 의미하며, 바람직하게는 비등점 이상의 온도를 가지는 수용액을 사용하는 것을 의미한다.
- <28> 또한 바람직한 산처리 공정은 구연산, 아세트산, 아스코르빈산 또는 이들의 하나 이상의 혼합물로 선택된 산 성분이 포함된 수용액, 바람직하게는 0.05% 내지 0.5% 정도의 구연산, 좀 더 바람직하게는 0.1% 구연산 수용액을 포함하는 비등점 이상의 온도를 가지는 수용액을 사용하는 것이다.
- <29> 또한, 물을 추출용매로 사용하는 경우, 아미그달린과 에멀신의 접촉면적을 줄이기 위해, 도인 또는 행인을 최소한으로 절단하는 것, 바람직하게는 상기 도인 또는 행인을 절반 이하로, 좀 더 바람직하게는 통째로 추출하는 것을 특징으로 하는 추출 방법을 제공한다.
- <30> 추가적으로, 메탄올 또는 부탄올을 추출용매로 사용하는 경우, 도인의 최대한의 표면적을 제공하는 조말 상태로 사용함을 특징으로 하는 추출 방법을 제공한다.
- <31> 본 발명의 도인 또는 행인으로부터 아미그달린을 추출하는 방법은 하기와 같다.
- <32> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- <33> 본 발명의 도인 또는 행인은 조말, 세절, 반절, 통째로 절단하고, 각 건조된 도인 및 행인의 무게(g)의 약 5배 내지 20배, 바람직하게는 약 10배 내지 15배의 물, 저급 알콜 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(g/ml)를 갖는 이들의 혼합용매를 사용해서 물은 100℃, 메탄올은 64.5℃의 각 비등점을 추출온도로 하여 약 30분 내지 6시간 정도에서 환류추출, 감압농축 등의 추출방법에 의하여 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합 용매에 따른 가용추출물을 추출, 농축하여 수득할 수 있다.
- <34> 또한 본 발명의 유효성분이 포함된 물 또는 메탄올 추출물은 상기 추출물을 물로 현탁한 후, 이를 현탁액이 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 비극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 2회 내지 5회 분획하여 제거한 후, 수층(水層)을 모아 고성능 액체크로마토그래피의 검액으로 사용하여 수행하여 아미그달린의 가용층을 얻을 수 있다.
- <35> 이하 구체적으로 도인 및 행인의 아미그달린 추출공정을 설명하면,
- <36> 예를 들어 도인을 조말, 세절, 반절, 통째로 나누고, 물, 메탄올 또는 에탄올 등과 같은 극성용매로 환류추출한 후에 여과하고, 감압농축하여 극성용매에 가용한 추출물을 얻는 제 1 단계;
- <37> 상기의 추출물을 물로 현탁한 후, 에틸아세테이트, *n*-헥산과 같은 비극성용매로 녹여 분별갈대기로 분리 및 여과하여 제거하고, 극성용매 추출물을 고성능액체크로마토그래피(HPLC)의 검액으로 사용하는 제 2단계로 구성된다.
- <38> 본 발명은 상기 제법을 포함하는, 도인 및 행인에 함유된 아미그달린을 최대한 추출할 수 있는 방법을 제공한다.

<39> 본 발명은 하기의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명은 이에 의해 제한되지는 않는다.

<40> 실시예 1. 외피한 도인의 메탄올 가용추출물의 제조방법

<41> 건조상태의 도인(약령시, 대구)을 정선한 후, 각각 조말, 세절, 반절, 통째로 나눠서 준비한 후에, 100 ml 비이커에 각 시료 2g씩을 넣고 메탄올 50ml를 가하여 각각 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간동안 환류추출하고, 각 상층액을 여과지(Whatman사)로 여과하여 도인의 찌꺼기를 제거하고 감압농축하였다. 물 50ml로 현탁한 후에, n -헥산 50ml를 가하여 분별깔대기에 넣고 n -헥산 불용성층(하층)과 n -헥산 가용성층(상층)으로 분획하고, n -헥산 불용성층을 수집하였다. 하층(물층)과 동일한 부피의 n -헥산 용매를 상기한 방법과 동일한 방법으로 3회 반복하여 비극성물질을 제거한 후에, 물층을 농축건조하여 시료로 사용하였다.

<42> 실시예 2. 외피한 도인의 물 가용추출물의 제조방법

<43> 추출용매를 물로 사용하고, 상기의 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<44> 실시예 3. 거피한 도인의 메탄올 가용추출물의 제조방법

<45> 건조상태의 도인의 껍질을 벗기고 정선한 후, 추출용매로 메탄올을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<46> 실시예 4. 거피한 도인의 물 가용추출물의 제조방법

<47> 건조상태의 도인(대구, 약령시)의 껍질을 벗기고 정선한 후, 추출용매로 물을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<48> 실시예 5. 외피한 행인의 메탄올 가용추출물의 제조방법

<49> 건조상태의 행인(충북, 모생당한약방)을 정선한 후, 추출용매로 메탄올을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<50> 실시예 6. 거피한 행인의 메탄올 가용추출물의 제조방법

<51> 건조상태의 행인(충북, 모생당한약방)의 껍질을 벗기고 정선한 후, 추출용매로 메탄올을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<52> 실시예 7. 외피한 행인의 물 가용추출물의 제조방법

<53> 건조상태의 행인(충북, 모생당한약방)을 정선한 후, 추출용매로 물을 사용하여 환류추출하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<54> 실시예 8. 거피한 행인의 물 가용추출물의 제조방법

<55> 건조상태의 행인(충북, 모생당한약방)의 껍질을 벗기고 정선한 후, 추출용매로 물을 사용하여 환류추출하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<56> 실시예 9. 거피한 행인의 끓는 물 가용추출물의 제조방법

<57> 건조상태의 행인(충북, 모생당한약방)의 껍질을 벗기고 정선한 후, 각각 세절, 반절, 통째로 나눠서 준비한 후, 100 ml 비이커에 끓는 물 50ml와 각 시료 2g씩을 넣고, 각각 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간동안 환류추출하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 시료를 수득하였다.

<58> 실시예 10. 거피한 행인의 0.1 % 구연산을 함유하는 끓는 물 가용 추출물의 제조방법

<59> 건조상태의 통째 행인의 껍질을 벗기고 정선한 후, 100 ml 비이커에 0.1 % 구연산 수용액 50ml를 가하여 끓이고, 통째 행인 2g을 넣어 각각 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간동안 환류추출하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 농축된 0.1 % 구연산 수용액층 시료를 수득하였다.

<60> 참조예 1. 고성능 크로마토그래피(HPLC) 장치

<61> 고성능 크로마토그래피(HPLC)는 M720 자외선 검출기를 갖춘 M930펌프(영린, 한국)를 사용하여 214nm에서 측정하였고, 컬럼은 캡셀 팩 C18 UG120(4.6mm ×250mm, 5 μ m, 시세이도사, 일본)을 사용하였다. 컬럼 오븐은 CTS30(영린, 한국)을 사용하여 35℃를 유지하도록 하였고, 유속은 1ml/분이었다. 이동상은 25% 메탄올(메탄올:물 = 25:75)을 사용하였으며, 유속은 1ml/분이었다.

<62> 실험예 1. 고성능 액체크로마토그래피의 캘리브레이션

- <63> 고성능 액체크로마토그래피를 표준화하기 위하여 보정을 하여 직선성을 확인하였고, 표준용액으로 분석용 아미그달린(동경화성사, 일본)을 사용하였으며, 증류수는 정제시스템(Pure powerⅢ, 대만)으로 정제하였다.
- <64> 캡셀 팩 C18 컬럼을 HPLC 컬럼 홀더에 설치하고 유속을 1ml/분, 자외선 탐지기의 파장을 214nm로 설정하였다. 컬럼을 1시간동안 이동상인 25% 메탄올로 세척을 하고, 수동 주입인 경우, 주사기로 실시예 1에서 제조된 아미그달린 시료 각 30 μ g/ml, 60 μ g/ml, 90 μ g/ml, 120 μ g/ml, 150 μ g/ml 그리고 300 μ g/ml를 포함하는 표준용액을 10 μ l씩 주입하며, 실온에서 HPLC시스템을 작동한다.
- <65> 실험 결과, 아미그달린의 피이크는 특별한 전처리없이 완전히 분리되었으며, 피이크 면적과 농도사이의 캘리브레이션 곡선은 좋은 직선성($r^2=0.9996$)을 보여주었다(도 1 참조).
- <66> 실험예 2. 외피한 도인의 메탄올 추출물의 아미그달린 추출을 검정
- <67> 실시예 1에서 제조된 외피한 도인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 메탄올 추출물을 상기 실시예1에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.
- <68> 실험 결과, 외피한 도인의 메탄올 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 2.8%이고, 세절은 2.8%이고, 반절은 1.6%이고, 통째는 0.5%를 나타냈으며, 조말과 세절은 거의 동일하였으나 추출이 완료되는데 도달하는 시간은 조말이 30분이고, 세절은 2시간 정도로 조말이 훨씬 빠른 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 절단된 크기가 작을수록, 아미그달린의 추출시간 및 추출율이 향상됨을 확인할 수 있었다(도 2 참조).

<69> 실험에 3. 거피한 도인의 메탄올 추출물의 아미그달린 추출을 검정

<70> 실시예 3에서 제조된 거피한 도인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 메탄올 추출물을 상기 실시예 3에 의한 전처리 방법 및 실험에 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

<71> 실험 결과, 거피한 도인의 메탄올 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 3.2%이고, 세절은 3.2%이고, 반절은 2.2%이고, 통째는 1.5%를 나타냈으며, 외피한 것에 비해서 절단크기별당 추출시간 및 추출율의 양상은 유사하였으나, 추출율은 외피한 것에 비해서 전반적으로 상당히 높아졌다. 실험에 2의 외피한 도인의 메탄올 추출물과 마찬가지로 절단된 크기가 작을수록 아미그달린의 추출시간 및 추출율이 좋아짐을 재확인할 수 있었다(도 3 참조).

<72> 실험에 4. 외피한 도인의 물 추출물의 아미그달린 함량 및 추출율 검정

<73> 실시예 2에서 제조된 외피한 도인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 물 추출물을 상기 실시예 2에 의한 전처리 방법 및 실험에 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

<74> 실험 결과, 외피한 도인의 물 추출물의 아미그달린 함량은 메탄올 추출실험과는 다른 양상을 보여주는 것을 확인할 수 있었고, 조말은 0.1%이고, 세절은 1.4%이고, 반절은 3.5%이고, 통째는 2.4%를 나타냈으며, 추출완결시간이 4시간 정도로 오래 걸렸다.

<75> 메탄올 추출물에는 작용하지 않았으나, 물 추출물일 경우 가수분해효소인 에밀신의 작용으로 조말은 아미그달린이 거의 다 분해됨을 알 수 있었고, 실제로 에밀신은 아미그달린을 가수분해하여 2분자의 글루코오스, 1분자의 시안화수소, 1분자의 벤즈알데히드를 생성하며, 아미그달린 뿐만 아니라 살리신, 아르부틴, 셀로비오스 등의 β -글루코시드도 가수분해한다. 그러

나 반절은 에멀신의 작용을 거의 받지 않았으므로, 절단크기가 커질수록 에멀신의 작용을 받지 않는다는 것을 알 수 있었다(도 3 참조).

<76> 실험예 5. 거피한 도인의 물 추출물의 아미그달린 추출을 검정

<77> 실시예 4에서 제조된 거피한 도인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 물 추출물을 상기 실시예 4에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

<78> 실험 결과, 거피한 도인의 물 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 0.3%이고, 세절은 1.4%이고, 반절은 3.5%이고, 통째는 3.5%를 나타냈으며, 반절과 통째는 2시간 정도에서 거의 다 추출됨을 확인하였다. 반절 이상의 경우는 에멀신의 작용을 거의 받지 않음을 재확인할 수 있었다(도 4 참조).

<79> 실험예 6. 아미그달린 추출율의 에멀신 영향 검정

<80> 에멀신의 주함유부위 및 작용 메카니즘을 알아보기 위하여, 아미그달린 추출율의 에멀신 영향 검정 실험을 실시하였다.

<81> 외피한 도인을 조말로 절단한 것, 거피한 도인을 조말로 절단한 것 그리고 거피한 도인의 얇은 껍질을 제거한 후, 조말로 절단한 것을 준비한 후에 물 50ml를 가하여 100℃에서 2시간 동안 환류추출하고, 각 상층액을 여과지(Whatman사)로 여과하여 도인의 찌꺼기를 제거한 후에, n -헥산 50ml를 가하여, 분별깔대기에 넣고 n -헥산 불용성층(하층)과 n -헥산 가용성층(상층)으로 분획하고, n -헥산 불용성층을 수집하였다. 하층(물층)과 동일한 부피의 n

-헥산 용매를 상기한 방법과 동일한 방법으로 3회 반복하여 비극성물질을 제거한 후에, 물층을 HPLC분석용 검체로 사용했으며, 상기 실험에 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

<82> 실험 결과, 외피한 도인의 물 추출물중에서 조말의 아미그달린 함량은 0.1% 정도이며, 거피한 도인의 아미그달린 함량은 0.3% 정도이고, 거피한 도인의 얇은 껍질을 벗긴 후, 조말로 해서 물로 추출했을 때의 아미그달린 함량은 3.2% 정도이다. 이 결과를 통해서 에멀신의 대부분이 껍질부근에 존재하고 있음을 알 수 있었고, 물을 용매로 가열하는 경우, 표피 부근에 대부분 분포되어있는 에멀신이 먼저 추출되므로 열에 의해서 활성을 잃어버리게 되고, 그 이후에 아미그달린이 추출되어지므로 에멀신의 영향을 전혀 받지 않고 거의 100% 추출되어진다고 여겨진다. 이에 비해, 조말인 경우는 에멀신과 아미그달린이 인접되어있는 상태에서 가열되므로, 에멀신이 실활되기 전에 아미그달린과 반응하여 아미그달린을 가수분해시킨다는 것을 확인할 수 있었다(도 6 참조).

<83> 결국 가수분해 효소인 에멀신은 메탄올을 추출용매로 사용하는 경우, 에멀신이 전혀 작용하지 못하므로 표면적이 제일 큰 조말 형태로 추출시에 가장 좋은 추출 효율을 보였으며, 물로 추출시, 조말인 경우는 에멀신과 아미그달린이 쉽게 작용하므로 아미그달린이 대부분 분해되어 추출율이 제일 낮았고, 도인의 크기를 크게 하면 에멀신과 아미그달린의 접촉면적이 없어지게 되어 아미그달린의 분해가 이루어지지 않고 추출율이 향상되었으므로, 에멀신의 영향없이 단시간에 추출가능한 조건은 반절이하의 거피한 도인을 사용하는 경우가 최대의 추출율을 보이는 조건이라는 것을 확인하였다.

<84> 상기의 결과들을 보면, 도인 또는 행인내 함유되어 있는 아미그달린을 에멀신의 영향없이 추출 용매에 따른 최적의 조건을 확인하였고, 이로써 항암제로 사용가능한 아미그달린을 고수율로 대량생산하여 수득할 수 있는 가능성을 확인하였다.

<85> 실험예 7. 외피한 행인의 메탄올 추출물의 아미그달린 추출을 검정

<86> 실시예 5에서 제조된 외피한 행인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 메탄올 추출물을 상기 실시예 5에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

<87> 실험 결과, 외피한 행인의 메탄올 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 5.2%이고, 세절은 5.1%이고, 반절은 1.7%이고, 통째는 1.2%를 나타냈으며, 조말과 세절은 거의 동일하였으나 추출이 완료되는데 도달하는 시간은 조말이 4시간이고, 세절은 5시간 정도로 조말이 약간 빠른 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 절단된 크기가 작을수록, 아미그달린의 추출시간 및 추출율이 향상됨을 확인할 수 있었다(도 7 참조).

<88> 실험예 8. 거피한 행인의 메탄올 추출물의 아미그달린 추출을 검정

<89> 실시예 6에서 제조된 거피한 행인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 메탄올 추출물을 상기 실시예 6에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

<90> 실험 결과, 거피한 행인의 메탄올 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 5.5%이고, 세절은 5.3%이고, 반절은 4.0%이고, 통째는 3.8%를 나타냈으며, 외피한 것에 비해서 절단크기별당 추출시간 및 추출율의 양상은 유사하였으나, 추출율은 외피한 것에 비해서 전반적으로 상당히 높아졌다. 실험예 7의 외피한 행인의 메탄올 추출물과 마찬가지로 절단된 크기가 작을수록 아미그달린의 추출시간 및 추출율이 좋아짐을 재확인할 수 있었다(도 8 참조).

<91> 실험예 9. 외피한 행인의 물 추출물의 아미그달린 함량 및 추출율 검정

- <92> 실시예 7에서 제조된 거피한 행인의 각 조말, 세절, 반절 그리고 통째의 물 추출물을 상기 실시예 7에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.
- <93> 실험 결과, 조말은 0.5%이고, 세절은 0.7%이고, 반절은 1.2%이고, 통째는 2.7%를 나타냈으며, 추출완결시간이 6시간 정도 걸렸다.
- <94> 메탄올 추출물에는 작용하지 않았으나, 물 추출물일 경우 가수분해효소인 에멀신의 작용으로 조말은 아미그달린이 거의 다 분해됨을 알 수 있었고, 실제로 에멀신은 아미그달린을 가수분해하여 2분자의 글루코오스, 1분자의 시안화수소, 1분자의 벤즈알데히드를 생성하며, 아미그달린 뿐만 아니라 살리신, 아르부틴, 셀로비오스 등의 β -글루코시드도 가수분해한다. 그러나 절단크기가 커질수록 에멀신의 작용을 받지 않는다는 것을 알 수 있었다(도 9참조).
- <95> 실험예 10. 거피한 행인의 물 추출물의 아미그달린 추출을 검정
- <96> 실시예 8에서 제조된 거피한 행인의 각 세절, 반절 그리고 통째의 물 추출물을 상기 실시예 8에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.
- <97> 실험 결과, 거피한 행인의 물 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 1.9%, 세절은 2.6%이고, 반절은 4.7%이고, 통째는 4.9%를 나타냈다. 통째의 경우는 다른 것들에 비해서 에멀신의 작용을 적게 받음을 알 수 있었으나 조말의 메탄올 추출물과 비교했을 때 적으므로 에멀신의 영향을 완전히 제거하지는 못했다.(도 10 참조).
- <98> 실험예 11. 거피한 행인의 끓는 물 추출물의 아미그달린 추출을 검정

- <99> 실시예 9에서 제조된 거피한 행인의 각 세절, 반절 그리고 통째의 끓는 물 추출물을 상기 실시예 9에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.
- <100> 실험 결과, 거피한 행인의 끓는 물 추출물의 아미그달린 함량은 조말은 5.3%이고 세절은 5.3%이고, 반절은 5.3%이고, 통째는 5.5%를 나타냈다. 통째가 5.5%로서 다른 것들에 비해서 약간 높았을 뿐 거의 차이가 없었다. 이 방법에 의하면 조말도 에멀신의 영향을 거의 받지 않고 절단에 의한 표면적의 차이에 의한 영향도 별로 받지 않음을 알 수 있었다.(도 11참조).
- <101> 실험예 12. 거피한 행인의 0.1% 구연산을 함유하는 끓는 물 추출물의 아미그달린 추출을 검정
- <102> 실시예 10에서 제조된 거피한 행인의 통째의 0.1% 구연산 함유하는 끓는물 추출물을 상기 실시예 10에 의한 전처리 방법 및 실험예 1의 방법을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.
- <103> 실험 결과, 거피한 행인의 0.1% 구연산을 함유한 끓는 물 추출물의 아미그달린 함량은 통째가 5.8%를 나타냈다. 기타의 방법보다 현저한 추출율을 보였으며, 또한 아미그달린이 네오아미그달린으로 변환되지 않는 효과적인 추출조건이라는 것을 확인하였다.
- <104> 상기의 결과들을 보면, 도인 또는 행인내 함유되어 있는 아미그달린의 네오아미그달린으로 변환을 억제하는 효과적인 조건을 발견하였으며, 도인 또는 행인의 절단면의 표면적을 조절하여 에멀신의 영향을 받지않는 방법 또한 확인하였다.

【발명의 효과】

- <105> 아미그달린이 가수분해효소인 에멀신의 영향으로 분해되지않게 하기위하여, 행인 또는 도인의 절단면의 표면적을 조절할 뿐만 아니라 추출용매로서 비등점의 온도를 가지는 물 또는

산성 함유 수용액을 사용함으로써, 최대의 추출율을 가지는 효과적인 추출 조건 및 방법을 제공하며, 아미그달린을 최대한으로 추출할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

도인(桃仁) 또는 행인(杏仁)으로부터 아미그달린(amygdalin)을 산성 조건하에서 추출 용매로 추출함에 있어서, 도인 또는 행인의 절단면의 표면적을 이용함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 도인 또는 행인은 거피하여 사용함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 추출 용매는 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 하나 이상의 혼합 용매를 선택하여 사용함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 물은 비등점 이상의 온도를 사용함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 산성 조건은 구연산, 아세트산, 아스코르빈산 또는 이들의 하나 이상의 혼합물로부터 선택된 산 성분이 포함된 용매를 선택하는 방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 산성 조건은 0.05 내지 0.5%의 구연산 성분이 포함된 용매를 선택하는 방법.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 0.1% 구연산을 함유하고 비등점 이상의 온도를 가지는 수용액을 사용함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1항 내지 7항 중 어느 한 항에 있어서, 물을 추출 용매로 사용하는 경우, 아미그달린과 에멀신의 접촉면적을 줄이기 위해, 도인 또는 행인을 최소한으로 절단함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 도인 또는 행인을 절반 이하로 절단하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

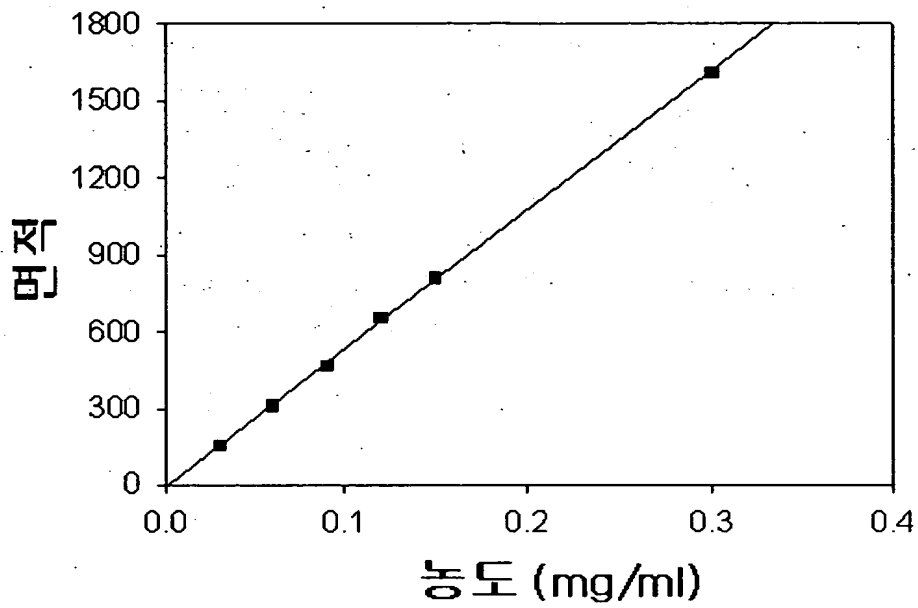
제 1항 또는 제 3항에 있어서, 메탄올을 추출 용매로 사용하는 경우, 도인 또는 행인의 최대한의 표면적을 제공하는 조말 상태로 사용함을 특징으로 하는 방법.

10200049091

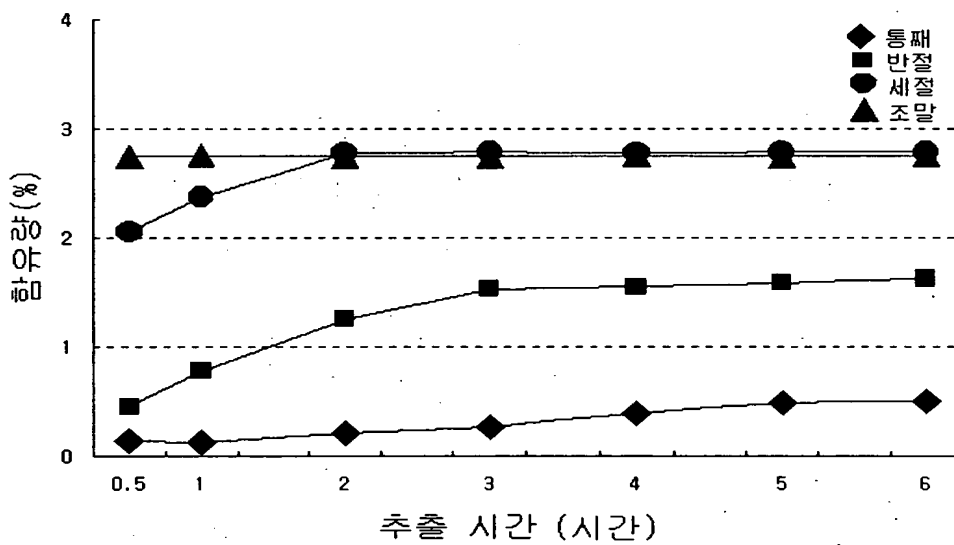
출력 일자: 2005/2/2

【도면】

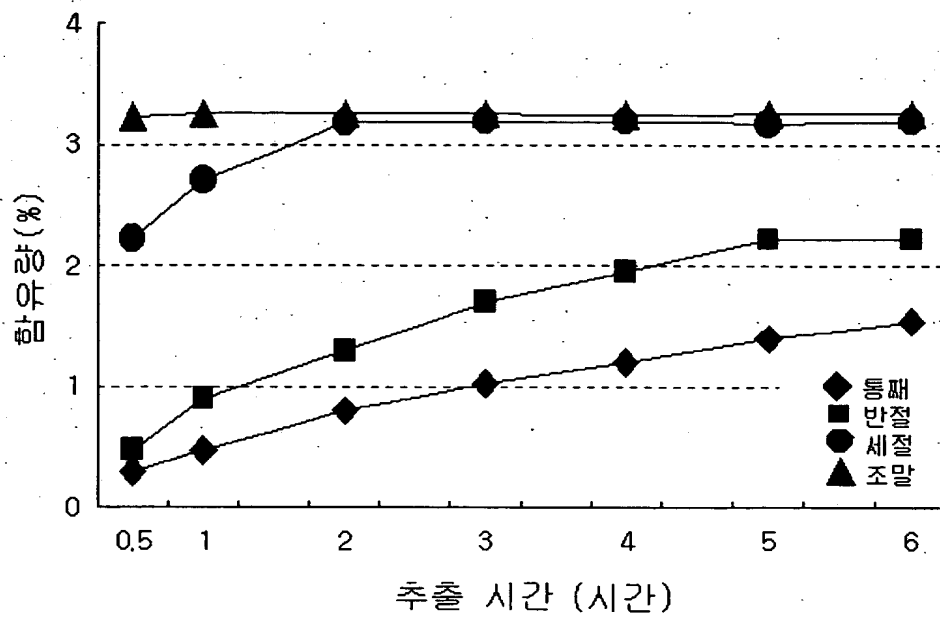
【도 1】



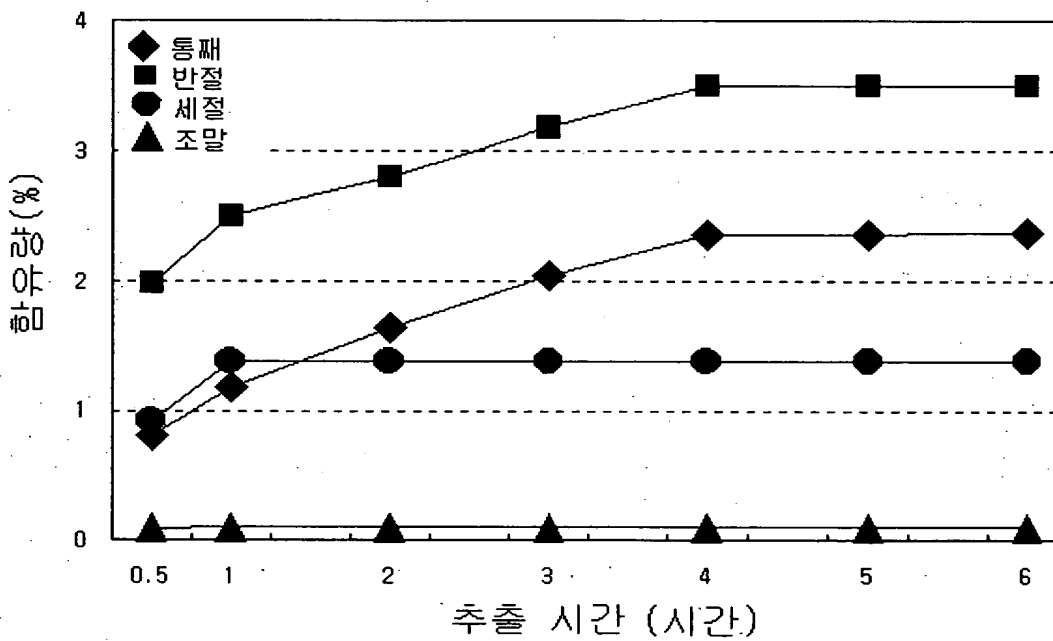
【도 2】



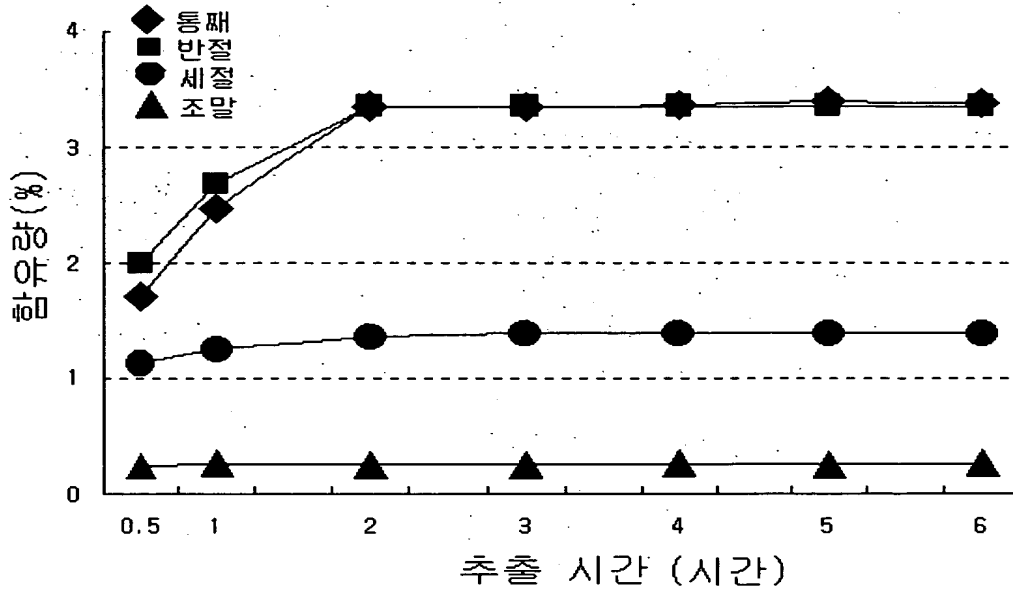
【도 3】



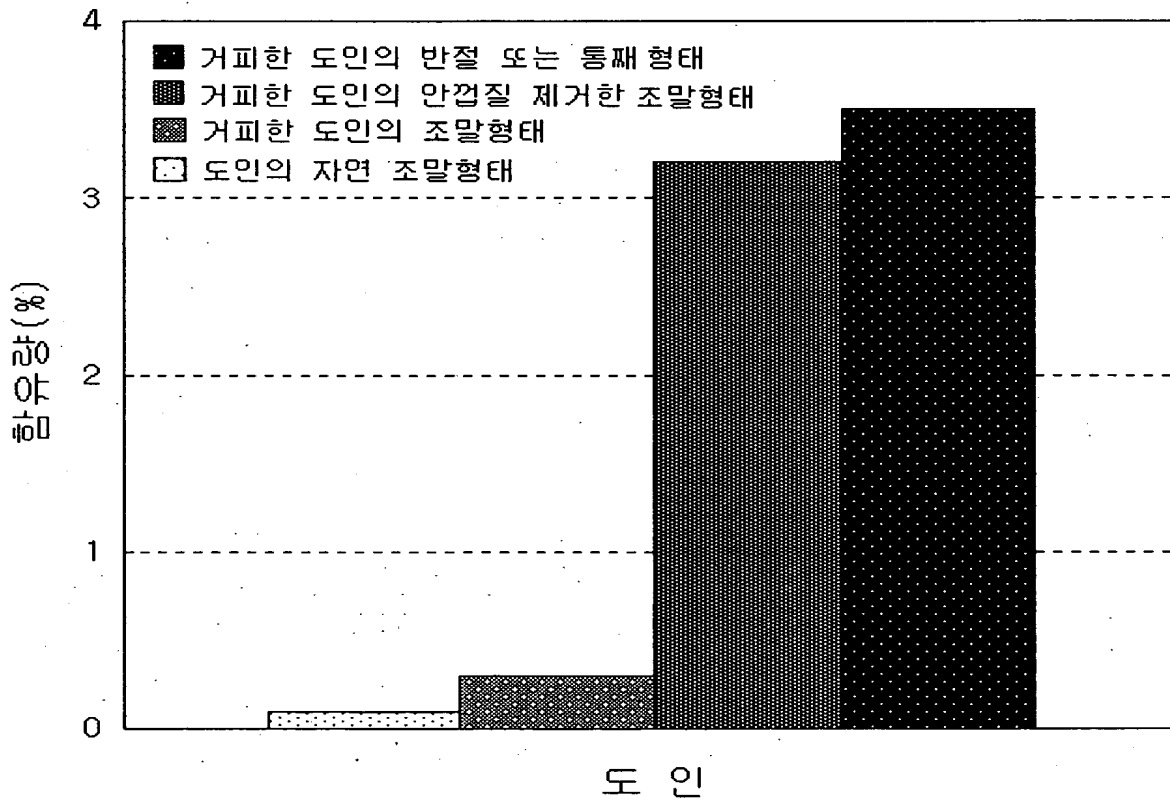
【도 4】



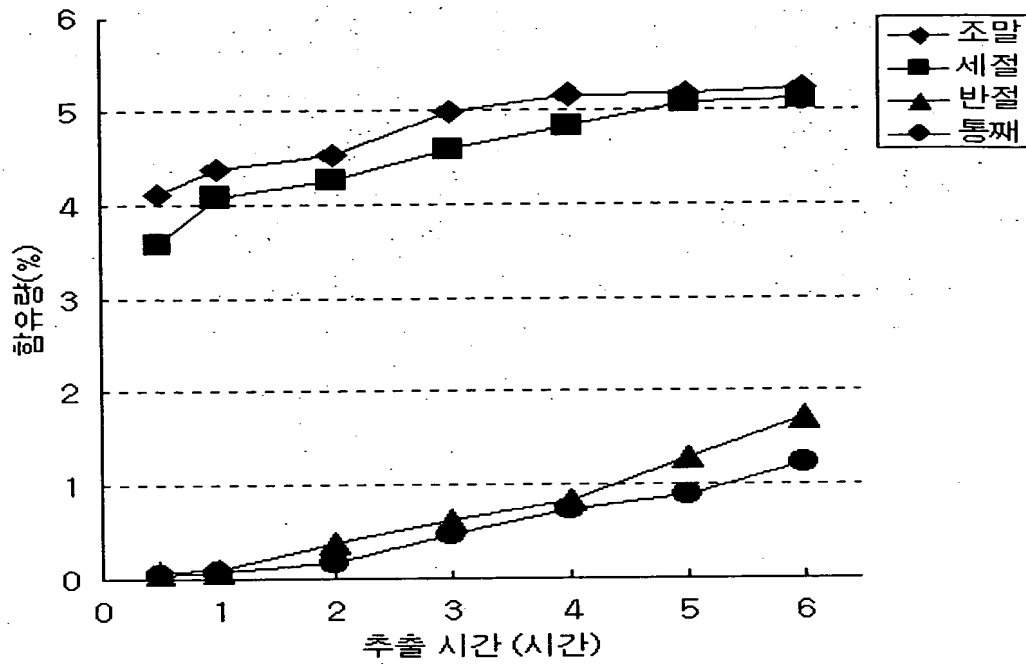
【도 5】



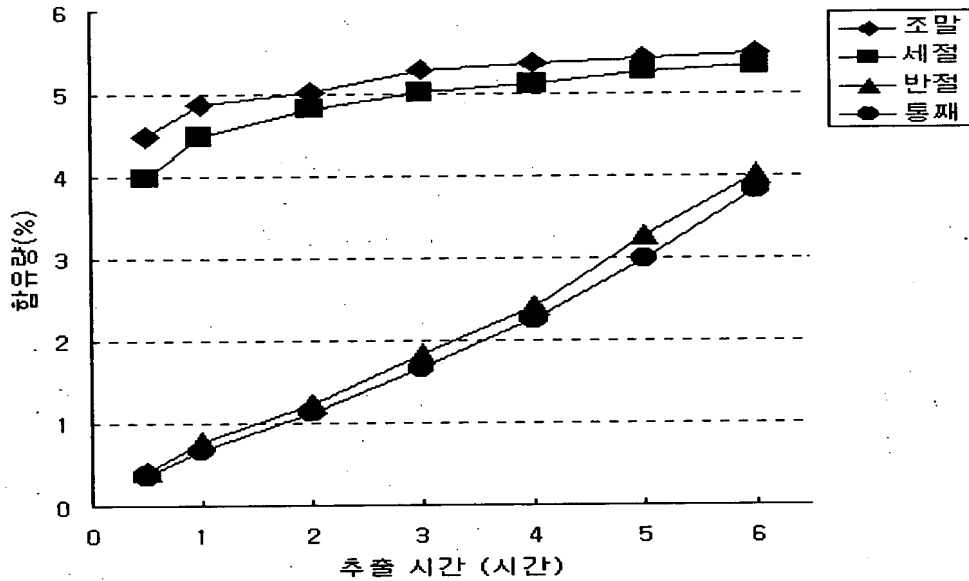
【도 6】



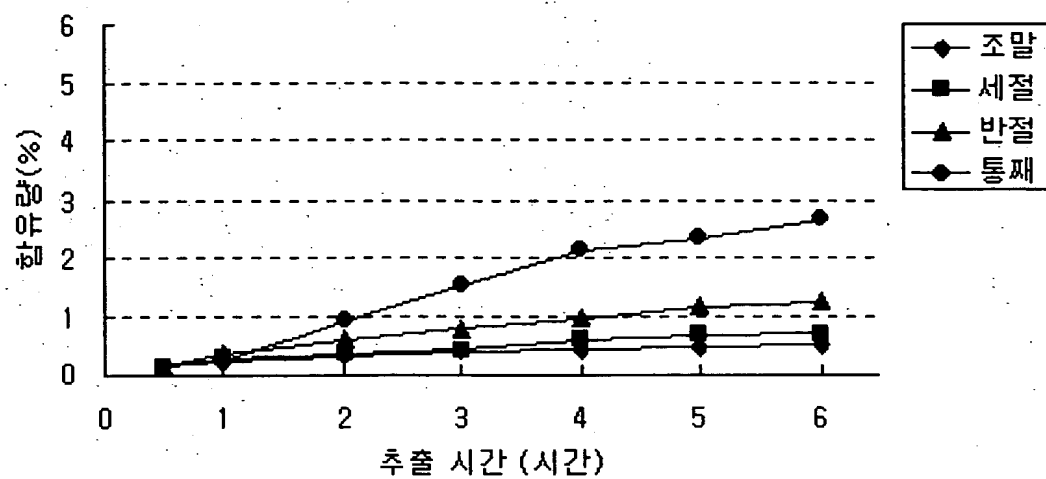
【도 7】



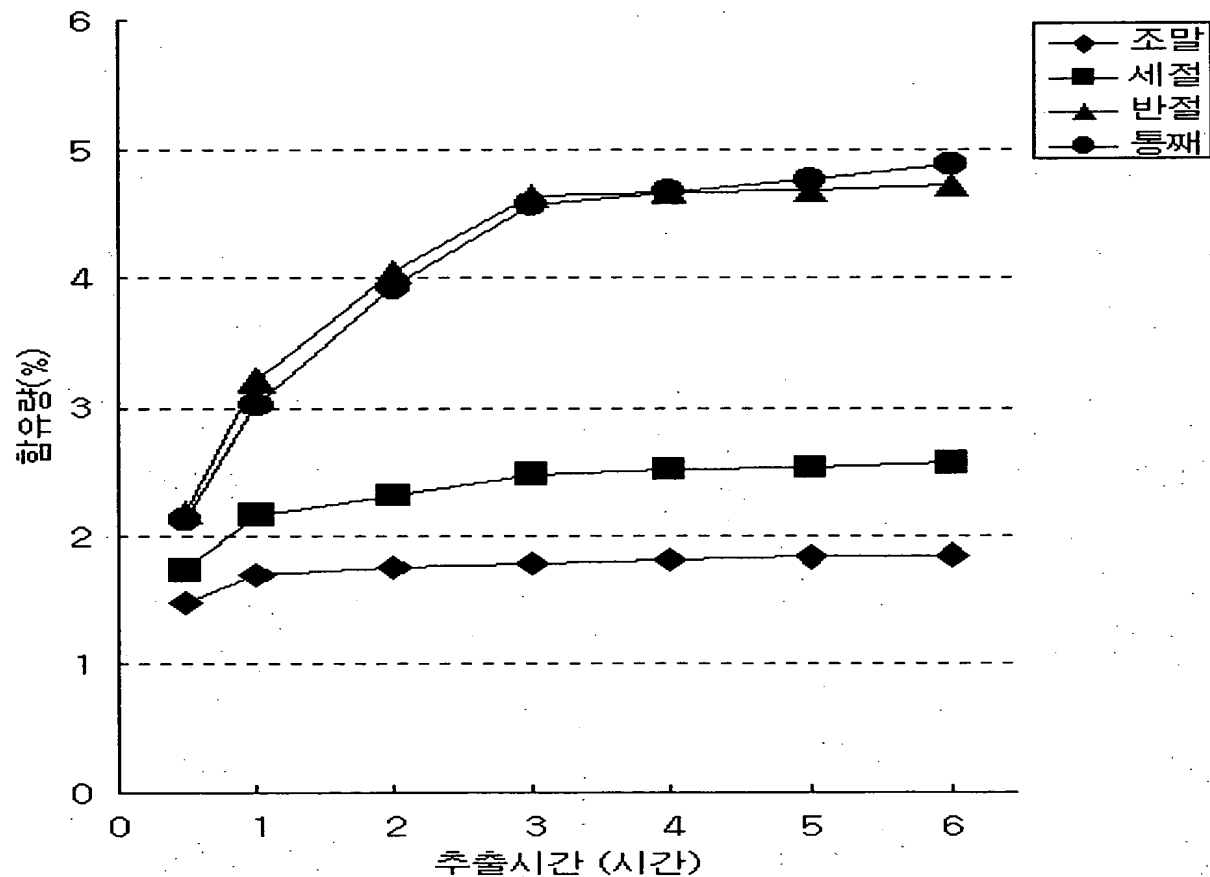
【도 8】



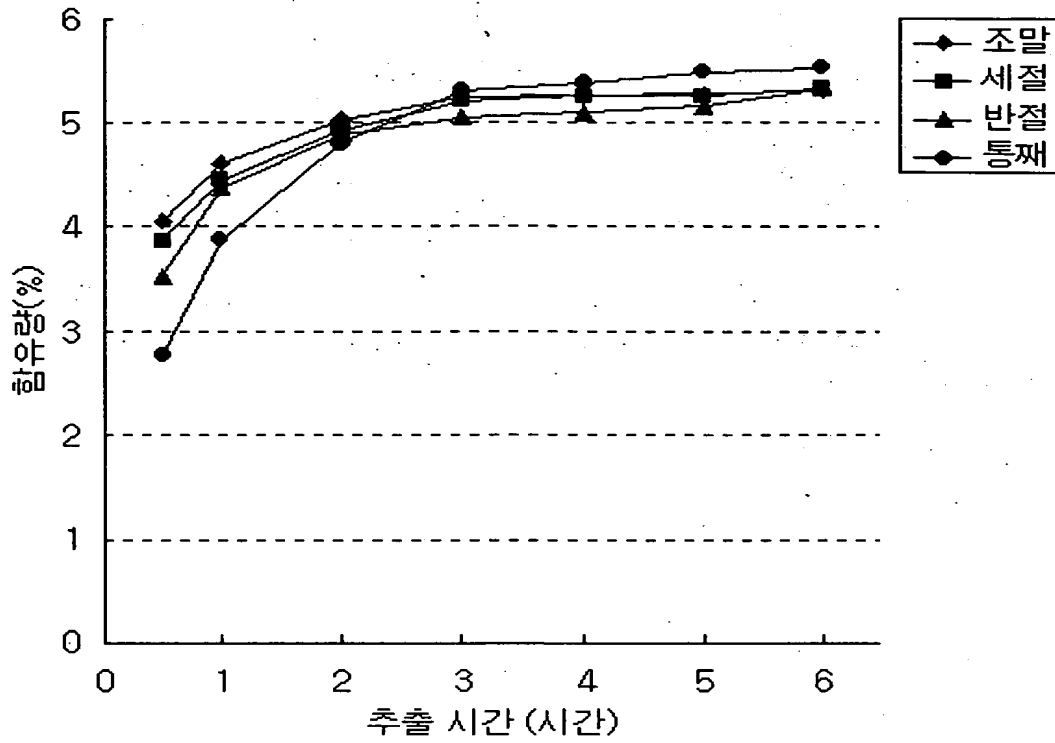
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【도 12】

